



El conducto excretor de la glándula de la cápsula de *Bolinus brandaris* (Gastropoda Prosobranchia): estudio estructural y ultraestructural

Structural and ultrastructural study of the excretor duct of the capsule gland of *Bolinus brandaris* (Gastropoda, Prosobranchia)

Ma José AMOR PÉREZ*, Montserrat RAMÓN** y Mercè DURFORT I COLL*

Recibido el 4-X-2002. Aceptado el 11-I-2003

RESUMEN

El conducto excretor de la glándula de la cápsula de *Bolinus brandaris* recorre la glándula en toda su longitud y está tapizado por un epitelio prismático ciliado y con microvilli que lo separa de los agregados glandulares adyacentes. Núcleo en posición basal, la heterocromatina se distribuye dispersa en el nucleoplasma, y en una banda periférica. El citoplasma presenta abundante glucógeno y gran cantidad de formaciones vesículo-membranosas; hay un gran desarrollo del complejo de Golgi y lisosomas, así como formaciones semejantes a figuras mielínicas, de naturaleza glucídica. El retículo endoplasmático está escasamente desarrollado. La presencia de cilios, microvilli e invaginaciones de la membrana basal corresponde a células con función de reabsorción, transporte y difusión de compuestos, las vesículas de secreción suponen además una función secretora. Se supone que estas células sintetizarían materias primas procedentes de las células glandulares vecinas. Esta hipótesis se basa no sólo en el gran desarrollo de los sistemas endomembranosos, sino también en la presencia de vesículas similares a las presentes en las células glandulares vecinas.

ABSTRACT

The excretory duct of the capsule gland of *Bolinus brandaris* runs along the gland and is covered by a columnar epithelium with microvilli and cilia which separates it from the adjacent gland complexes. Nucleus located in the base of the cell. Scattered drops of heterochromatin could be seen in the nucleoplasm. An heterochromatin band was also found around the periphery. The cytoplasm was homogeneously full of glycogen. Vesicle-membranous formations were well developed (especially, a Golgi body). Associated to the latter were abundant vesicles, lysosomes, and glucidic myelin-like bodies. The endoplasmic reticulum was not well developed. The presence of cilia, microvilli and basal membrane invaginations is typical of cells dedicated to transport, resorption and diffusion; the highly-developed membranes also suggest a secretion role. It is possible that material previously synthesized in neighbouring gland cells could be transported for further elaboration in these cells. The presence of vesicles similar to those found in neighbouring gland cells and the well-developed endomembranous structures support this hypothesis.

PALABRAS CLAVE: Aparato reproductor femenino, conducto excretor, glándula de la cápsula, epitelio vibrátil, endomembranas.

KEY WORDS: Female reproductive system, excretory duct, capsule gland, vibratile epithelium, endomembranes.

* Departamento de Biología Celular. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. Avda. Diagonal 645. 08028. Barcelona.

** Institut de Ciències del Mar (CSIC). Pg. Marítim 37. 08003. Barcelona

INTRODUCCIÓN

El aparato reproductor de los moluscos presenta diversos grados de complejidad en base al tipo de fecundación: si es externa el sistema reproductor es muy sencillo, si es interna es altamente complejo (JONG-BRINK, BOER Y JOOSSE, 1983). En los moluscos con fecundación interna se describen tres tipos de glándulas accesorias: la glándula de la albúmina, responsable de la formación de las cubiertas oocitarias; glándula ingestiva (receptáculo seminal), donde tiene lugar la fecundación y posterior degradación de los espermatozoides sobrantes o defectuosos y la glándula de la cápsula, donde los huevos fecundados son empaquetados definitivamente para la puesta. Estas tres glándulas están comunicadas entre sí y surcadas por un conducto (oviducto) que, partiendo del ovario las atraviesa. El conducto excretor de la glándula de la cápsula es por tanto una doble vía: de entrada de los espermatozoides, y de salida de los huevos (FETTER, 1941; HYMAN, 1967; GRASSÉ, 1968; OEHLMANN, STROBEN Y FIORONI, 1988; SCHULTE-OEHLMANN, FIORONI, OEHLMANN Y STROBEN, 1994 y OEHLMANN, FIORONI, STROBEN Y MARKERT, 1996).

Al ser interna la fecundación de *Bolinus brandaris*, estos tres tipos glandulares se hallan presentes en su aparato reproductor femenino. Los aspectos estructurales y ultraestructurales del conducto excretor de la glándula de la cápsula, son objeto del presente trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Glándulas de la cápsula de hembras de *Bolinus brandaris*, procedentes de diversos puntos de la costa catalana, (principalmente Sant Carles de la Ràpita, Tarragona), fueron extraídas y procesadas para su estudio en microscopía óptica y electrónica.

Para el estudio en microscopía óptica, glándulas enteras fueron fijadas en formol 10%, e incluidas en parafina. Cortes de 6 μ m de grosor, fueron teñidos con las técnicas de: hematoxi-

lina-eosina, Mallory, y la técnica histoquímica del ácido periódico de Schiff (PAS) específica para la detección de carbohidratos.

Para la observación en microscopía electrónica, pequeñas secciones de glándulas (1mm de grosor), fueron procesadas con la técnica convencional de la doble fijación glutaraldehído 2,5%-paraformaldehído 3,5% y tetróxido de osmio al 2%, tamponados con tampón fosfato (Sörensen). Tras una deshidratación progresiva, fueron incluidas en resina Spurr. Cortes semifinos (1 μ m de grosor) a fin de seleccionar el área donde realizar los cortes ultrafinos (30 nm) se tiñeron con azul de metileno-bórax. Los cortes ultrafinos fueron realizados con un ultramicrotomo Reichert-Omu provisto de cuchilla de diamante. Tras ser recogidos con rejillas de cobre, se procedió al doble contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. En los casos que se realizó la técnica citoquímica de Thiéry, detectora de carbohidratos, las muestras fueron recogidas con rejillas de oro y no contrastadas posteriormente. Las observaciones se realizaron con los microscopios electrónicos Philips 301 y Hitachi 600, de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La glándula de la cápsula de *Bolinus brandaris*, tal como está descrito en otras especies (HYMAN, 1967; GRASSÉ, 1968 Y OEHLMANN ET AL., 1988) es la mayor de las glándulas del tracto genital femenino. Macroscópicamente, la glándula de la cápsula de *Bolinus brandaris* presenta morfología redondeada, alargándose ligeramente en sus extremos. Exteriormente es de color blanco-ocre, y está dividida en dos lóbulos, derecho e izquierdo, semejante a las descripciones de FETTER (1941) y OEHLMANN ET AL., 1996. Muy desarrollada en la época de madurez sexual (primavera principalmente), en épocas de reposo (resto del año), está prácticamente atrofiada.

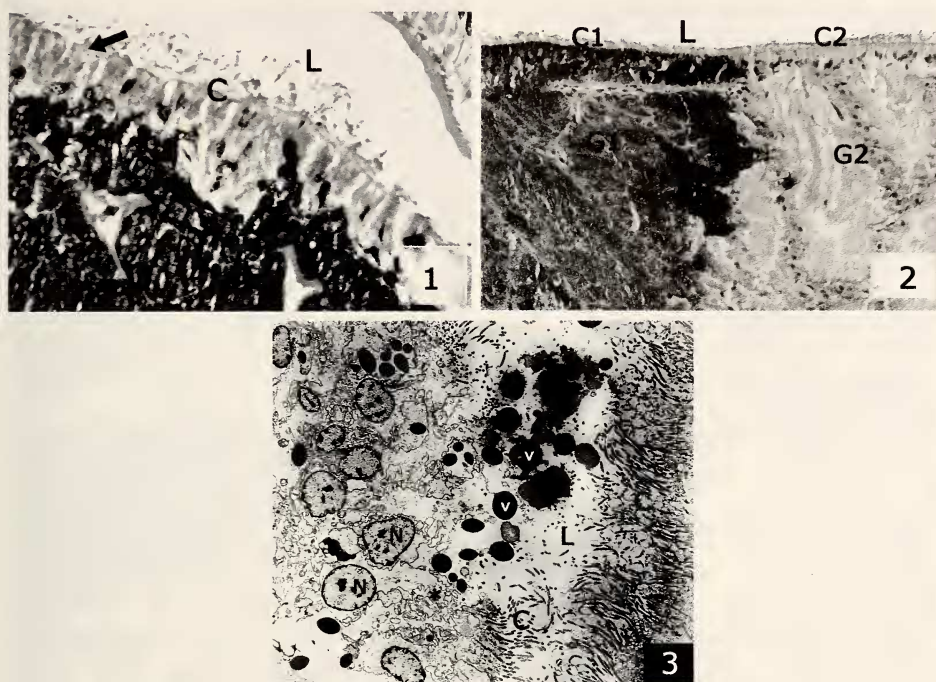


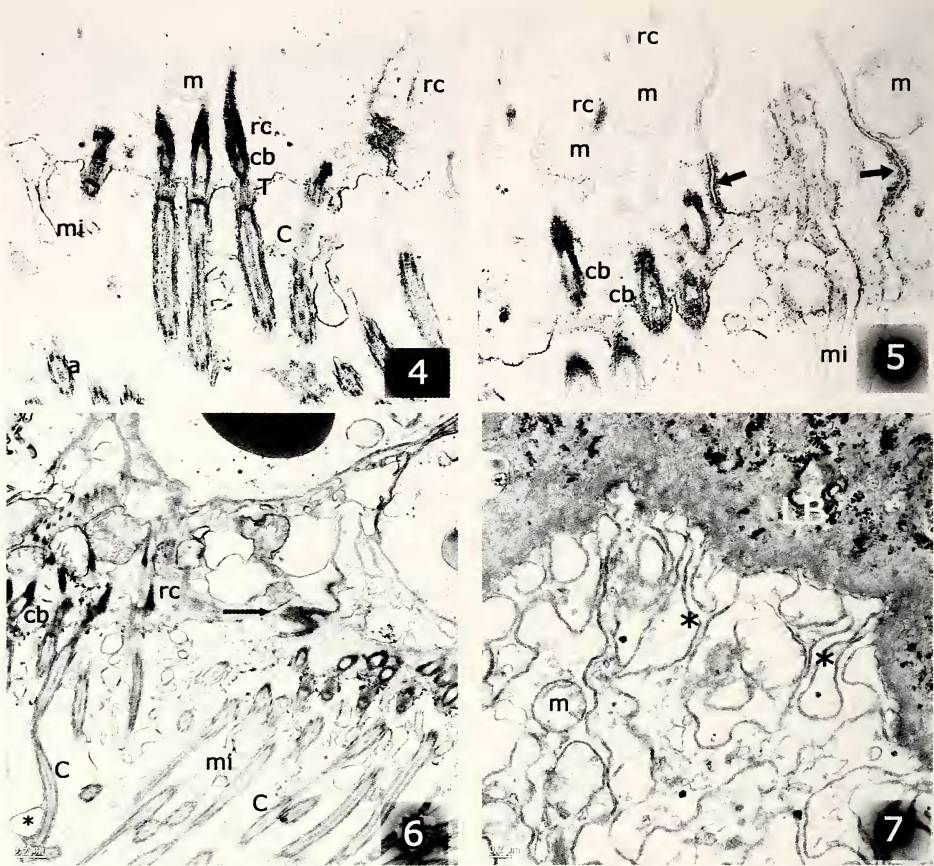
Figura 1. Detección de la glándula de la cápsula a nivel de la luz (L) del conducto excretor. Puede observarse cómo las células del epitelio ciliado (C) son invadidas por material basófilo (Flecha) similar al contenido en las glándulas adyacentes. Hematoxilina- eosina. Figura 2. Zona colindante entre dos áreas glandulares diferentes (G1 y G2): Mientras G1 es altamente eosinófila, G2 presenta una clara basofilia. Obsérvese como los epitelios ciliados correspondientes a estas áreas (C1 y C2), presentan afinidades tintoriales diferentes entre sí, y similares a la de sus glándulas adyacentes. Hematoxilina- eosina. Figura 3. Panorámica ultraestructural del epitelio ciliado del conducto excretor donde se aprecian los núcleos (N), los cilios (C) así como múltiples formaciones membranosas (asterisco) . En la luz del conducto (L) pueden apreciarse vesículas de diverso tamaño y electrodensidad (v).

Figure 1. The excretory duct of the capsule gland showing its lumen (L). Ciliate cells (C) are invaded by basophilic material (arrow). See its similarity of this material with that inside of the neighbouring cells. Hematoxilin-eosin. Figure 2. Detail of two different areas of glandular masses. While G1 has eosinophil pH, G2 has intense basophilia. The ciliate epithelia next to these areas (C1 and C2) have varying staining properties. However, these properties are similar to those of their neighbouring glands. Hematoxilin-eosin. Figure 3. Ultrastructural observation of the ciliated epithelium of the excretor duct. Observe nuclei (N), cilia (C) as well as several membranous formations (asterisk). Vesicles (v) of different size and electrodensity appear in the lumen (L).

A microscopía óptica, y tal como se observa en varias especies (HYMANN, 1967; GRASSÉ, 1968; SHULTE-OEHLMANN ET AL., 1994; FETTER Y GRAHAM, 1994; OEHLMANN ET AL., 1996) se observa que ambos lóbulos están formados por masas glandulares de diferente naturaleza, que se ponen en evidencia por su diferente afinidad tintorial, cuyo contenido es excretado a un conducto irregular que

surca a la glándula en toda su longitud (Figs. 1, 2). Este conducto excretor está tapizado por un epitelio prismático ciliado (75 μ m de altura) y con microvilli como se observa con el microscopio electrónico (Figs. 3-5). La afinidad tintorial de estas células es similar a la de las células glandulares vecinas.

La imagen ultraestructural de este epitelio corresponde a la descrita en la



Figuras 4-6. Zona apical del epitelio ciliado. Obsérvense los cilios (C) mostrando sus partes características: el axonema en secciones transversales (a), la zona de transición (necklace) (T), el corpúsculo basal (cb) y las raíces ciliares próximas a mitocondrias (m). Asimismo pueden detectarse microvilli (mi) y desmosomas (flecha). Véase la presencia de un cilio en forma de “discocilio” en la Figura 6 (asterisco). Figura 7. Detalle de la parte basal celular. Puede observarse la lámina basal (LB) y las múltiples invaginaciones de la membrana plasmática basal (asterisco).

Figures 4-6. View of the apical area of ciliate epithelia. The typical structure of cilia (C) is apparent, i.e. transversal sections of the axoneme (a), the transition zone (necklace) (T), the basal body (cb) and the rootlets besides mitochondria (m). Microvilli (mi) and desmosomes (arrow) are also apparent. Modified cilia, i.e. disk-cilia, can be seen in Figure 6 (asterisk). Figure 7. View of a basal cell. The basal lamina (LB) and the multiple invaginations of the basal membrane are visible (asterisk).

mayoría de oviductos, tanto de invertebrados como de vertebrados (FETTER, 1941; SHULTE-OEHLMANN ET AL., 1994; OEHLMANN ET AL., 1996; PALMER Y GUILLETTE, 1988 y HAGIWARA, 1995) mostrando células ciliadas, con núcleo basal, y gránulos de electrodensidad variable en su citoplasma que también se detectan en la luz del conducto (Fig. 3). A mayores aumentos, se

observa, como se ha citado anteriormente, la presencia de cilios y microvilli en su cara apical (Figs. 4 y 5). Estos cilios tienen un corpúsculo basal de $0,2 \mu\text{m}$, que se prolonga con la característica raíz ciliar de aspecto estriado (DENTLER, 1981; DUSTIN, 1984; DENTLER, 1990; AMOR, 1992, 1996; HAGIWARA, 1995) de $0,8 \mu\text{m}$ de longitud y con una periodicidad de 8 nm . En

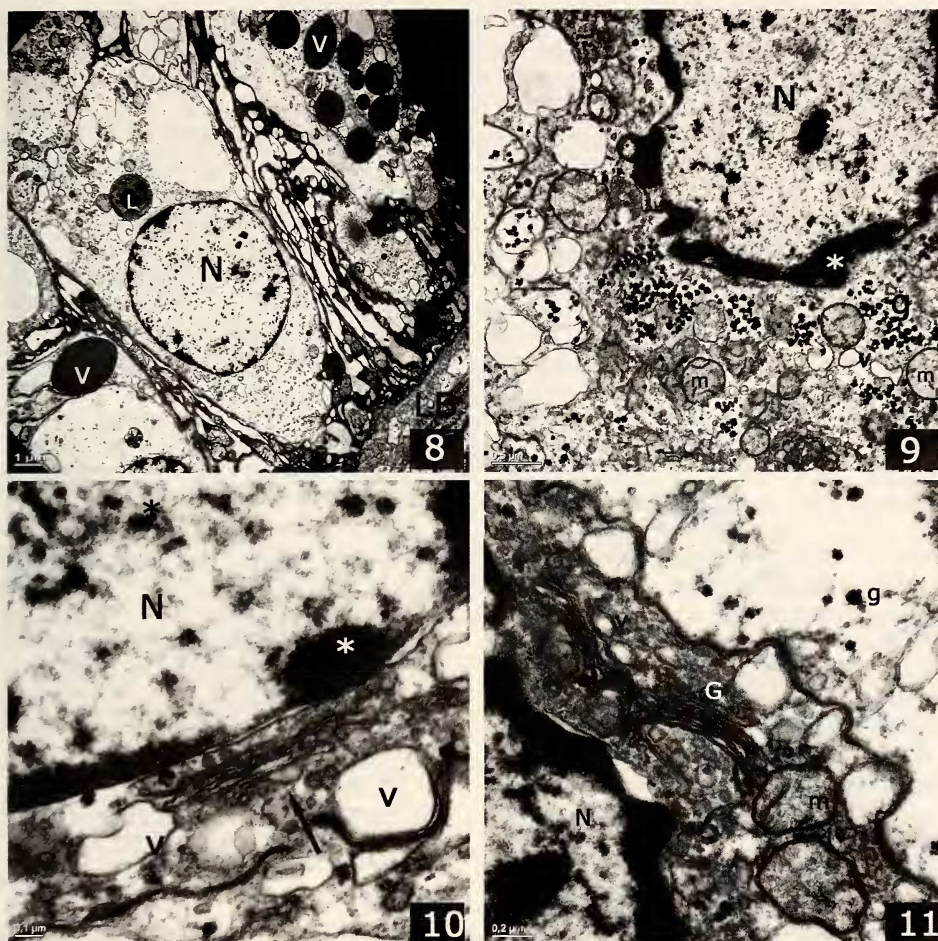


Figura 8. Sección longitudinal de la zona basal de una célula prismática. Se observa el núcleo (N) la lámina basal (LB), múltiples repliegues de la membrana plasmática (asterisco) así como lisosomas (L) y diversos orgánulos vesículo-membranosos (v) dispersos por el citoplasma. Figura 9. Sección del núcleo rodeado de mitocondrias (m), gránulos de glucógeno (g) y vesículas de diferentes tamaños (v). Figuras 10, 11. Imágenes de las diversas morfologías adoptadas por el complejo de Golgi (G) en sus proximidades al núcleo (N). Obsérvese asimismo la presencia de glucógeno (g), mitocondrias (m) y vesículas de diferentes tamaños (v).

Figure 8. Longitudinal section of the basal area of a prismatic cell. See the nucleus (N) and the basal lamina (LB) as well as invaginations in the basal plasma membrane (asterisk), lysosomes (L) and vesicle membranous organelles (v) spread through the cytoplasm. Figure 9. Ultrastructure view of the nucleus surrounded by mitochondria (m), glycogen granules (g) and different-size vesicles. Figures 10, 11. Different shapes adopted by the Golgi body (G) near the nucleus (N). Glycogen granules (g), mitochondria (m) and different size vesicles (v) are also seen.

sentido ascendente se observa el característico *necklace* o zona de transición (AMOR, 1996) que acaba en el cilio característico. En un 3% de cilios, aparecen dilataciones en la parte apical del mismo configurando

el tipo discocilia semejantes al gonoducto masculino de esta especie. (AMOR, 1992, 1996). Aunque ha sido discutida la real existencia de este tipo de cilios con anomalías morfológicas, actualmente está

ampliamente aceptada su existencia, significando una facilitación en la circulación de material denso (DURFORT, BOZZO, POQUET, SAGRISTÀ, FERRER, GARCÍA VALERO, AMOR Y RIBES, 1990; CAJARAVILLE, MARIGÓMEZ Y ÁNGULO, 1990, AMOR, 1992, 1996; HAGIWARA, OHWADA, AKOI AND TANAKA, 2000; LUDIN Y SCHAUDER, 2001). En el caso presente, sería lógica su presencia ya que por este conducto han de circular tanto las secreciones segregadas como los oocitos en todas sus fases. Es frecuente la presencia de mitocondrias junto a estas raíces ciliares que, como ha sido ya descrito, supone aporte energético (DURFORT, AMOR, FERRER, GARCÍA VALERO, POQUET, RIBES Y SAGRISTÀ, 1988; DURFORT, BOZZO, POQUET, SAGRISTÀ, FERRER, GARCÍA VALERO, AMOR Y RIBES, 1990 y AMOR, 1992) (Figs. 4, 5). La longitud de los cilios varía según el tramo del conducto del que se trate. En el inicio del conducto, es decir la parte proximal al ovario, los cilios son más cortos (12,5 μm) que en la parte distal del mismo (20 μm), lo que podría facilitar la evacuación de los huevos encapsulados.

La zona lateral de la membrana plasmática, en su parte más cercana a la luz, presenta las características uniones celulares, se trata de largos desmosomas en

banda, de hasta casi 3 μm de longitud con la característica morfología de anillo rodeando dos membranas contiguas (CLIFFE, 2002) (Figs. 4, 5). No se encuentran sin embargo adyacentes a uniones septadas como se describe en otros invertebrados (DUVERT, GROS Y SALAT, 1980; AMOR, 1992; KNOX Y BROWN, 2000)

La zona basal de la membrana plasmática, se apoya en la lámina basal, y presenta múltiples invaginaciones que invaden gran parte del citoplasma (Fig. 7). Esta morfología de invaginaciones basales asociada a microvilli corresponde a un patrón celular de un epitelio de absorción y difusión de productos, citado por AMOR (1992) en el gonoducto masculino de esta especie.

El núcleo se encuentra en la zona basal de la célula. Presenta morfología oval-redondeada (6,2 μm) con un patrón de heterocromatina dispuesto en grumos dispersos por el nucleoplasma y una banda de heterocromatina periférica (Figs. 3, 8-11). Formaciones de tipo golgiano son frecuentes en sus proximidades (Figs. 10, 11).

El resto del citoplasma se halla invadido por gránulos de glucógeno, distribuido de forma homogénea en el interior celular, mitocondrias, algunas de las cua-

(Página derecha) Figuras 12-15. Diversas morfologías del comportamiento del complejo de Golgi. Figura 12. Dictiosomas (flechas) rodeados de pequeñas vesículas de secreción (v), y otras de mayor tamaño, que por su morfología podrían corresponder a mitocondrias degeneradas (asterisco). Figuras 13, 14. Dictiosomas (flechas) con gran actividad secretora (v). En la Figura 13 se observa la presencia de vesículas similares a mitocondrias degeneradas (asterisco) y en la Figura 14, puede observarse parcialmente una vesícula de alta electrodensidad (asterisco). Figura 15. Dos dictiosomas concéntricos (G) rodeados de pequeñas vesículas (v), otras medianas cargadas de material electrodens (+) y unas mayores (asterisco) de posible origen mitocondrial. Se observan asimismo gránulos de glucógeno (g). Figura 16. En esta imagen se aprecia la presencia de un cuerpo multivesicular (CM) y un lisosoma (L), rodeados de vesículas (v) de variado tamaño. Figura 17. Cuerpo residual (CR) muy frecuente en este tipo de células.

(Right page) Figures 12-15. Detail of different shapes of the Golgi body. Figure 12. Dyctiosomes (arrows) surrounded by little secretion vesicles (v). Larger vesicles are also detected (asterisk). Their morphology suggests they are degenerate mitochondria. Figures 13, 14. Dyctiosomes (arrows) with intense secretory activity (v). Note the vesicle-like degenerate mitochondria (asterisk) in Figure 13. A high electrodensity vesicle is partially visible in Figure 14 (asterisk). Figure 15. Concentric dyctiosomes (G) surrounded by little vesicles (v). Also median vesicles containing electrodense material (+), large vesicles possibly derived from degenerate mitochondria (asterisk) and glycogen granules are shown. Figure 16. Multivesicular body (CM) and lysosome (L) surrounded by different-size vesicles (v). Figure 17. Residual body. Typical of this kind of cells.

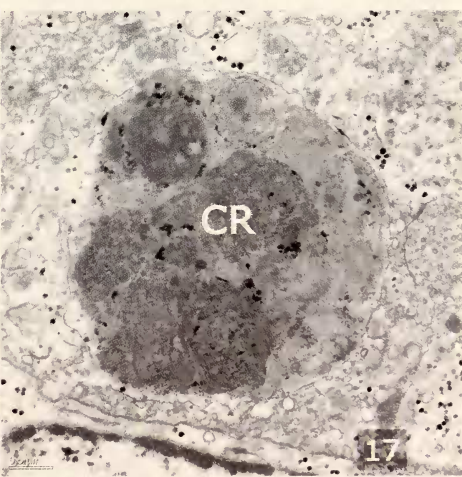
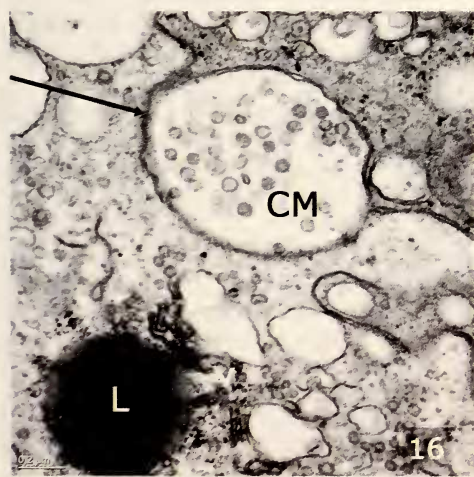
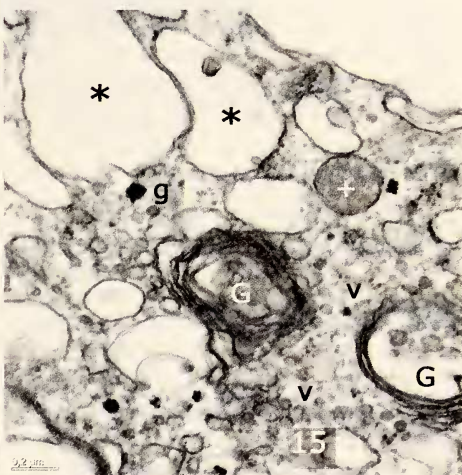
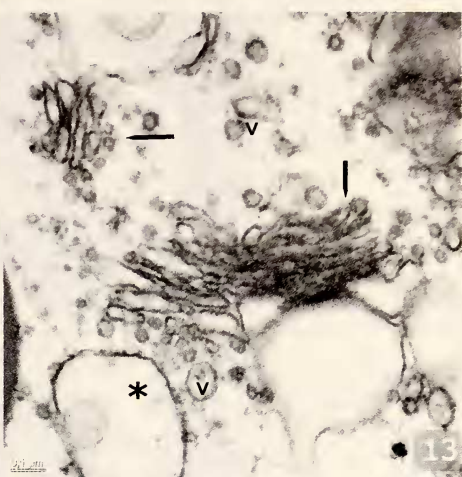
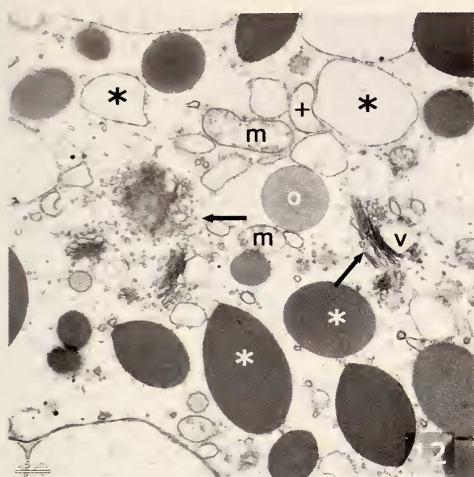




Figura 18. Formaciones membranosas similares a figuras mielínicas, tratadas con la técnica de Thiéry (asterisco), lo que confirma su naturaleza membranosa y no artefactual.
Figure 18. Thiéry's technique corroborates that myeline-like figures (asterisk) are membranes, not artifacts.

les parecen presentar pérdida progresiva de crestas (Figs. 12, 15). El sistema membranoso más desarrollado es el complejo de Golgi (Figs. 12-15). Este está formado por múltiples dictiosomas de morfología muy variada, que se rodean de múltiples formaciones vesículo-membranosas. Es frecuente encontrar cuerpos multivesiculares y lisosomas en diversas fases de formación (Figs. 16, 17), así como formaciones membranosas Thiéry positivas, que recuerdan figuras mielínicas (Fig. 18). El hecho de ser Thiéry positivas confirma su naturaleza glucídica descartando que se trate de artefactos, hecho que se da también en ciertas fases de la formación de las plaquetas vitelinas (AMOR, RAMÓN Y DURFORT, 2001). Algunas de estas vesículas presentan material de variable electrodensidad (Figs. 12, 14), que pueden visualizarse también tanto en las células glandulares vecinas como en la luz del conducto. Se observa además la presencia de gránulos muy semejantes tanto por su afinidad tintorial como por las reacciones histo-citoquímicas a los gránulos presentes tanto en la luz del conducto como en las células glandulares vecinas. Este hecho podría

sugerir una actividad elaboradora por parte de estas células, donde las materias primas (productos glandulares sintetizados en las glándulas vecinas) serían transferidos a estas células que, mediante el complejo de Golgi los convertiría en gránulos de secreción. Estos gránulos, serían incorporados a vesículas de origen golgiano y mitocondrias degeneradas, a manera de las plaquetas vitelinas en los oocitos (AMOR ET AL., 2001). El hecho del gran desfase entre el alto desarrollo del complejo de Golgi y el escaso desarrollo del retículo endoplasmático parece apoyar esta hipótesis.

A diferencia de otros Gasterópodos (VERMEIRE Y HINCH, 1984), en este conducto no se detectan células caliciformes.

AGRADECIMIENTOS

A David Balayla por su asesoramiento en la lengua inglesa y a Enric València por su ayuda en el procesamiento digital de las fotografías.

Este proyecto está financiado por el Centre de Referència d'Aquicultura de la Generalitat de Catalunya.

BIBLIOGRAFÍA

- AMOR, M. J., 1992. Ultrastructural study of the mucosa of the male gonoduct of *Murex brandaris* (*Hexaplex brandaris*) (Gastropoda, Prosobranchia). *Invertebrate Reproduction and Development*, 21 (2): 149-160.
- AMOR, M. J., 1996. Presence of abnormal cilia in the mucosa of the male gonoduct of *Bolinus* (*Murex*) *brandaris* (Gastropoda, Prosobranchia, Muricidae). *Iberus*, 14 (2): 169-178.
- AMOR, M. J., RAMÓN, M. Y DURFORT, M., 2001. Vitellin platelets formation on oogenesis of *Bolinus* (*Murex*) *brandaris*. *Mycroscopy* 2001. Barcelona. Abstracts.: 234.
- CAJARAVILLE, M. P., MARIGÓMEZ, J. A. AND ANGULO, E., 1990-1991. Light and electron microscope study of the gills epithelium of *Littorina littorea* (Gastropoda, Prosobranchia). *Biological Structure and Morphology*, 3 (1): 1-12.
- CLIFF, A., 2002. Localizing adherens junctions. *Trends in Cell Biology*, 12 (6): 252.
- DENTLER, W., 1981. Microtubule-membrane interactions in cilia and flagella. *International Review of Cytology*, 72: 1-47.
- DENTLER, W., 1990. Linkages between microtubules and membranes in cilia and flagella. "Ciliar and flagellar membranes". Robert A. Bloodgood. Plenum Press. London.: 31-64.
- DURFORT, M., AMOR, M. J., FERRER, J., GARCÍA VALERO, J., POQUET, M., RIBES, E Y SAGRISTÁ, E., 1988. Caracterización ultraestructural del epitelio branquial de *Tapes decussatus* L. (Mollusca, Bivalvia). *Iberus*, 8 (2): 141-152.
- DURFORT, M., BOZZO, M. G., POQUET, M., SAGRISTÁ, E., FERRER, J., GARCÍA VALERO, J., AMOR, M. J. Y RIBES, E., 1990. Ultraestructura del epitelio vibrátil de los gonoductos de *Tapes decussatus* y *Tapes semidecussatus*. *Actas del III Congreso Nacional de Acuicultura*: 587-592.
- DUSTIN, P., 1984. *Microtubules*"2ª ed. Springer-Verlag. Berlin. 482 pp.
- DUVERT, M., GROS, D. AND SALAT, C., 1980. The junctional complex in the intestine of *Sagitta setosa* (Chaetognatha): the paired septate junction. *Journal of Cell Sciences*, 42: 227-246.
- DUVERT, M., AND GROS, D., 1982. Further studies on the junctional complex in the intestine of *Sagitta setosa*. Freeze fracture on the plated septate junction. *Cell and Tissue Research*, 225 (3): 663-671.
- FRETTER, V., 1941. The genital ducts of some British Stenoglossan Prosobranchs. *Journal of Marine Biological Association, United Kingdom*, 25: 173-211.
- FETTER, V. AND GRAHAM, A., 1994. *British Prosobranch Molluscs*. The Ray Society, London, 765 pp.
- GRASSÉ, PP., 1968. *Traité de Zoologie*. T. V. Fasc. 3. Masson et Cie. París. 919 pp.
- HAGIWARA, H., 1995. Electron microscopic studies of ciliogenesis and ciliary abnormalities in human oviduct epithelium. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*, 100 Supplement 1: 451-459.
- HAGIWARA, H., OHWADA, N., AKOI, T AND TANAKA, K., 2000. Ciliogenesis and ciliary abnormalities. *Medical Electron Microscopy*, 33 (3): 109-114.
- HYMAN, L. H., 1967. "The Invertebrate". Vol. VI, Mollusca I. McGraew-Hillad. New York. 550 pp.
- JONG-BRINK, M. DE, BOER, H. H. AND JOOSSE, J., 1983. *Reproductive Biology of Invertebrates*. Mollusca. Vol. I Oogenesis, Oviposition and Oosorption. K. G. Adiyodi y R. G. Adiyodi. John Wiley & Sons. New York. 770 pp.
- KNOX, A. L. AND BROWN, N. H., 2002. Rap1GT-Pase regulation of adherens junction positioning and cell adhesion. *Science*, 295: 1285-1287.
- KORKANOVA, E. E. AND MARCHENKOV, A. V., 2000. Structure of the epithelium of the parasitic turbellaria *Notenera ivanovi* (Turbellaria: Fecampiida). *Parazitologiya*, 34 (6): 515-521.
- OEHLMANN, J., STROBEN, E. UND FIORONI, P., 1988. Zur anatomie und histologie des fortpflanzungssystems von *Nucella lapillus* (L. 1758) (Prosobranchia, Stenoglossa). *Zoologischer Anzeiger*, 221: 101-116.
- OEHLMANN, J., FIORONI, P., STROBEN, E. AND MARKERT, B., 1996. Tributyltin (TBT) effects on *Ocenebrina aciculata* (Gastropoda, Muricidae): imposex development, sterilisation, sex change and population decline. *Science of the Total Environment*, 188: 205-223.
- PALMER, B. D. AND GUILLETTE, L. J. Jr., 1988. Histology and morphology of the female reproductive tract of the tortoise *Gopherus polyphemus*. *American Journal of Anatomy*, 183 (3): 200-211.
- SCHULTE-OEHLMANN, U., FIORONI, P., OEHLMANN, J. AND STROBEN, E., 1994. The genital system *Marisa cornuaretis* (Gastropoda, Ampullariidae) -a morphological and histological analysis. *Zoologische Beiträge N. F.* 36 (1): 59-81.
- THIERY, J. P., 1967. "Staining methods for sectioned materia". Ref. Lewis Knight. North Holland 1977.
- VERMEIRE, P. E. AND HINCH, G. W., 1984. Structure of the female reproductive tract of the apple snail. II. Scanning electron microscopy. *Tissue and Cell*, 16 (1): 107-114.